

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
13. Oktober 2005 (13.10.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/094895 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 47/48**,  
31/505, A61P 37/06

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,  
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,  
ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/003460

(22) Internationales Anmeldedatum:  
1. April 2005 (01.04.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart*): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,  
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2004 016 355.3 2. April 2004 (02.04.2004) DE

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **ALBUPHARM HEIDELBERG GMBH & CO. KG** [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 582, 69120 Heidelberg (DE).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*  
— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **SINN, Hannsjörg** [DE/DE]; Lederschenstrasse 52, 69168 Wiesloch (DE).

(74) Anwälte: **WEICKMANN & WEICKMANN usw.**; Postfach 860 820, 81635 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart*): AE, AG, AL,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**WO 2005/094895 A1**

(54) Title: PRODUCTION AND USE OF THE METHOTREXATE-ALBUMIN CONJUGATE AS AN IMMUNOSUPPRESSIVE AGENT IN GVHD

(54) Bezeichnung: HERSTELLUNG UND VERWENDUNG DES KONJUGATS METHOTREXAT-ALBUMIN ALS MITTEL ZUR IMMUNSUPPRESSION BEI GVHD

(57) Abstract: The invention relates to the use of active ingredient protein conjugates for modulating and in particular preventing immune reactions associated with transplant operations. The invention also relates to novel advantageous production methods for the inventive conjugates.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Wirkstoff-Protein-Konjugaten zur Modulierung und insbesondere zur Vermeidung von Transplantation-assoziierten Immunreaktionen. Weiterhin betrifft die Erfindung neue, vorteilhafte Herstellungsverfahren für die erfindungsgemäß einsetzbaren Konjugate.

**Herstellung und Verwendung des Konjugats Methotrexat-Albumin als  
Mittel zur Immunsuppression bei GVHD**

**Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Wirkstoff-Protein-Konjugaten zur Modulierung und insbesondere zur Vermeidung von  
5 Transplantation-assoziierten Immunreaktionen. Weiterhin werden neue, vorteilhafte Herstellungsverfahren für die erfindungsgemäß einsetzbaren Konjugate bereitgestellt.

Wirkstoff-Protein-Konjugate werden verwendet, um durch Kopplung von körperfremden Wirkstoffen an ein körpereigenes Protein längere Halbwertszeiten bei Verabreichung von therapeutischen oder/und diagnostischen Wirkstoffen zu erhalten (vgl. DE 41 22 210 A1 oder WO96/32133). Bei der Behandlung von Tumorerkrankungen wird die Aufnahme von Proteinen durch proliferierende Tumorzellen ausgenützt, um den an Proteine gebundenen Wirkstoff in solchen Zellen anzureichern, während gesundes Ge  
10 webe keine Veranlassung zur Proteinaufnahme hat. Dadurch kann eine Anreicherung der Wirkstoffe in Tumorzellen erhalten werden.  
15

So beschreibt DE 41 22 210 A1 Konjugate aus einer tumoraktiven Verbindung, die mindestens eine Carboxylgruppe aufweist, und einem Protein, das vom Organismus nicht als fremd angesehen wird, wobei das Protein in nativer Form vorliegt. Diese Konjugate werden zur Behandlung von Tumorerkrankungen, jedoch nicht bei Transplantations-assoziierten Immunreaktionen eingesetzt. Weiterhin wird ein Verfahren zur Herstellung  
20 solcher Konjugate beschrieben.  
25

Aus der europäischen Patentanmeldung EP 0 879 604 A1 sind Konjugate, umfassend einen Folsäureantagonisten und einen Träger, bevorzugt natives Protein, Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung zur Behandlung von Tumorerkrankungen, Entzündungen und/oder  
30

- 2 -

Autoimmunerkrankungen, jedoch nicht zur Behandlung von Transplantations-assoziierten Immunreaktionen bekannt.

Allogene Knochenmarktransplantationen (KMT) werden in zunehmenden Maß bei der hochdosierten Strahlentherapie, Therapie haematologisch-onkologischer Erkrankungen, beispielsweise von Leukämien, Lymphomen, aplastischer Anämie oder Nierenzellkarzinomen eingesetzt. Sie sind jedoch nach wie vor, insbesondere bedingt durch immunologische Komplikationen, beispielsweise in Form der Graft-Versus-Host-Krankheit (GVHD) mit einer erheblichen direkten und indirekten Morbidität und Mortalität assoziiert, was ihre breitere Anwendbarkeit einschränkt.

Levy offenbart in seiner Veröffentlichung (Chem. Abstracts 83 in Agents and Actions, 1975, 5. Ausgabe, Nr. 3, S. 268 – 271) die immunsuppressive Wirkung von Cyclophosphamid und Methotrexat, welche immunmodulierende Medikamente sind, auf die Graft-Versus-Host-Krankheit (GVHD) im Ratten- und Mausmodell.

Die bis zum jetzigen Zeitpunkt eingesetzten immunmodulierenden Medikamente konnten zwar die Mortalität der akuten und chronischen GVHD zum Teil vermindern, versagen jedoch bei einem Teil der Patienten und sind teilweise auch mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Hier dominiert als Folge einer breiten Immunsuppression die Gefahr der systemischen Infektion. Dazu kommt eine Reihe Medikamenten-spezifischer Organtoxizitäten der bisher eingesetzten Medikamente, die insbesondere unter der häufig langwierigen Anwendung über Wochen oder Monate zu Komplikationen führen.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, ein Arzneimittel bereitzustellen, mit dem die im Stand der Technik auftretenden Schwierigkeiten überwunden werden können und mit dem insbesondere die Überlebensrate bei allogenen Knochenmarktransplantationen verbessert werden kann.

5 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung eines Konjugats, umfassend eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung und ein Protein zur Herstellung eines Arzneimittels zur Modulierung einer Transplantations-assozierten Immunreaktion.

10 Es wurde nun festgestellt, dass Konjugate aus Carboxylgruppen-haltigen organischen Verbindungen und Proteinen, insbesondere Albumin oder Transferrin auch erfolgreich zur Modulierung von Transplantations-assozierten Immunreaktionen eingesetzt werden können.

15 Die erfindungsgemäß eingesetzten Konjugate enthalten eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung, bei der es sich insbesondere um einen Wirkstoff, mehr bevorzugt um einen niedermolekularen Wirkstoff mit einem Molekulargewicht  $\leq 1000$  Da und mehr bevorzugt  $\leq 500$  Da handelt. Besonders bevorzugt handelt es sich bei dem Wirkstoff um ein Cytostatikum bzw. um ein Immunsuppressivum. Besonders bevorzugt wird Methotrexat bzw. Aminopterin, am meisten bevorzugt Methotrexat eingesetzt. Der Folsäure-Antagonist Methotrexat oder 4-Amino-4-desoxy-10-methylfolsäure 20 (C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub>) ist ein Cytostatikum. Dieser Wirkstoff ist ein bewährter niedermolekularer Wirkstoff bei der Prophylaxe von GVHD und hat eine Dosis-abhängige immunsuppressive Wirkung. In der erfindungsgemäß verabreichten Konjugatform kann bei insgesamt geringer und somit nebenwirkungsfreier Verabreichung eine hohe Konzentration und insbesondere eine immunsuppressive Menge des Wirkstoffs am gewünschten Wirkort erreicht 25 werden.

30 Das erfindungsgemäße Konjugat umfasst Proteine in nativer Form. Das Protein weist bevorzugt als Molekulargewicht von  $\geq 18.000$  Da, mehr bevorzugt  $\geq 50.000$  Da auf. Günstigerweise wird, je nach Patient, dem das Konjugat verabreicht werden soll, ein entsprechendes natives Protein, insbesondere Albumin ausgewählt, also beispielsweise für die Verabreichung an Menschen ein humanes Protein und bei der Verabreichung an Tiere, bei-

spielsweise Mäuse, entsprechend ein Maus-Protein. Geeignete Proteine sind z.B. Albumin, insbesondere humanes Serumalbumin (HSA) oder Transferrin. Besonders bevorzugt wird Albumin als Protein eingesetzt.

5 Die kovalente Bindung niedermolekulare r Wirkstoffe an das Makromolekül  
Albumin wird beispielsweise in der DE 41 22 210 A1 oder in der WO  
96/32133 beschrieben, wobei dort das Konjugat zur Behandlung von Tumor-  
erkrankungen bzw. zur Behandlung von Entzündungs-, Infektions- und/oder  
Hauterkrankungen eingesetzt wird. Es wurde nun festgestellt, dass sich sol-  
10 che Konjugate auch hervorragend zur Prophylaxe bzw. Behandlung von  
Transplantations-assoziierten Immunreaktionen, wie beispielsweise GVHD  
eignen. Die erfindungsgemäß eingesetzten Konjugate ermöglichen eine  
deutlich gezieltere und optimierte Wirkung, insbesondere von Cytostatika  
15 und anderen Wirkstoffen in entzündlichem Gewebe und proliferierenden  
Stoffwechsel-aktiven Zellen. Bei einer Transplantation sind die relevanten  
Zellen reaktive Lymphozyten und Zellen des monozyten Phagozytensystems  
(MPS), hier insbesondere die dendritischen Zellen der reaktiven lymphati-  
tischen Gewebe. Es wurde zudem überraschenderweise festgestellt, dass  
20 die erfindungsgemäß eingesetzten Konjugate nicht eine generelle Immunsuppression im gesamten Organismus verursachen sondern vielmehr eine  
selektive Modulierung und insbesondere Suppression von Transplantations-  
assoziierten Immunreaktionen und bevorzugt von GVHD bewirken.

25 Die optimierte Aufnahme wird insbesondere durch eine günstige Kinetik von  
Albumin, beispielsweise mit einer Plasmahalbwertszeit von ca. 19 Tagen im  
Menschen, und durch die Bedeutung von Albumin als potenzieller Nährstoff  
für proliferierende Zellen bewirkt. Während bei der Verabreichung von freien  
Wirkstoffen der Anteil der Wirkstoffe, die in den für Transplantations-assozii-  
erte Immunreaktionen relevanten Zellen nur kurzzeitig zur Wirkung gekom-  
30 men sehr gering ist, ermöglichen die erfindungsgemäßen Konjugate eine  
Anreicherung des Wirkstoffs in den relevanten Zellen über einen langen  
Zeitraum.

Aufgrund der langen biologischen Halbwertszeit ist z.B. der Aktivitätsanteil im Blut des Konjugats MTX-HSA etwa 300 mal größer als der des niedermolekularen MTX alleine.

- 5 Im Organismus werden unbekannte Substanzen üblicherweise schnell ausgeschieden bzw. abgefangen, beispielsweise wasserlösliche Verbindungen über die Nieren ausgeschieden oder wasserunlösliche Verbindungen innerhalb weniger Minuten von der Leber abgefangen. Körpereigene Eiweiße, beispielsweise Albumin haben dagegen eine lange Verweilzeit im Organismus. Es ist in hohen Mengen in Geweben vorhanden und nicht immunogen. Durch Kopplung von an sich schnell aus dem Körper entfernt werdenden Wirkstoffen an solche körpereigene Eiweiße werden die Wirkstoffe vor den Ausscheidungs- bzw. Abfangmechanismen des Körpers verborgen und können somit ebenfalls eine lange Halbwertszeit im Körper erreichen. Dadurch ist es aber möglich, nur geringe Mengen an Wirkstoff zu verabreichen und somit gegebenenfalls auftretende Nebenwirkungen praktisch vollkommen auszuschalten. Toxische Effekte auf gesundes Gewebe oder Organe erfolgt praktisch nicht, da normale Zellen keine Veranlassung zur Proteinaufnahme haben. Es wurde nun überraschenderweise festgestellt, dass die erfindungsgemäßen Konjugate nicht nur in Tumorzellen sondern auch in für Transplantations-assoziierten Immunreaktionen relevanten Zellen aufgenommen werden und somit zu einer Wirkstoffanreicherung in diesen Zellen führen.
- 25 Aufgrund der langen Verweildauer der erfindungsgemäß eingesetzten Konjugate im Körper kann eine Prophylaxe oder/und Behandlung von GVHD erfolgreich durchgeführt werden, auch wenn die Intervalle zwischen den einzelnen Verabreichungen des Konjugats mehr als 5 Tage, vorzugsweise mehr als 10 Tage, insbesondere mehr als 13 Tage oder sogar mehr als 20 Tage betragen. Auf diese Weise ist es möglich, Patienten ohne das Auftreten von Nebenwirkungen über Jahre hinweg z.B. alle 2 bis 3 Wochen eine entsprechende Erhaltungsdosis zu verabreichen.

Die erfindungsgemäßen Konjugate enthaltend einen kovalent an ein Protein, insbesondere an Albumin gebundenen Wirkstoff, bevorzugt Methotrexat, eignen sich zur Modulierung und insbesondere zur Vermeidung von Transplantation-assoziierten Immunreaktionen. Unter Modulierung wird dabei hierin jede Beeinflussung bzw. Veränderung der Immunreaktionen verstanden und insbesondere eine Verstärkung oder Verringerung der Immunreaktion, insbesondere um mindestens 10 %, bevorzugt um mindestens 20 %. Besonders bevorzugt wird eine wesentliche Verringerung um z.B. mindestens 50 %, mehr bevorzugt um mindestens 70 % oder eine Vermeidung der Transplantations-assoziierten Immunreaktionen erreicht. Diese Wirkung eröffnet ein breites Einsatzspektrum für die erfindungsgemäßen Konjugate zur Vermeidung immunologischer Komplikationen bei Transplantationen, insbesondere bei allogenen oder autologen Knochenmarktransplantationen aber auch zur Vermeidung von Empfänger-vermittelten Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen, insbesondere bei Fremdspender-Organtransplantationen von beispielsweise Niere, Herz oder Leber.

Die erfindungsgemäßen Konjugate können deshalb vorteilhafterweise zur Behandlung oder/und Prophylaxe von GVHD und insbesondere von akuter oder chronischer GVHD eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Konjugate eignen sich insbesondere zur Verabreichung an Menschen.

Die Verabreichung der erfindungsgemäßen Konjugate erfolgt in der Regel intravenös. Für eine wirksame Behandlung werden als Dosiseinheit vorzugsweise 0,1 bis 1000 mg Konjugat pro kg Körpergewicht, insbesondere 1 bis 100 mg Konjugat pro kg Körpergewicht verabreicht. Mit den erfindungsgemäßen Konjugaten kann bei geringer Dosierung von z.B. ≤ 5 mg und insbesondere ≤ 3 mg Konjugat pro kg Körpergewicht bereits eine Wirkung erzielt werden. In den Konjugaten beträgt das Molverhältnis von Wirkstoff zu Trägerprotein vorzugsweise 1:1000 bis 2:1, insbesondere 1:100 bis 1,1,

besonders bevorzugt 0,9 bis 1,1:1. So zeigt z.B. Albumin bei einer 1:1 Beladung mit Methotrexat immer noch natives Verhalten. Eine Dosisseinheit an Wirkstoff beträgt vorzugsweise 0,1 bis 100 mg pro kg Körpergewicht, insbesondere 1 bis 10 mg pro kg Körpergewicht, wobei oftmals geringe Dosiseinheiten von ≤ 5 mg, insbesondere ≤ 2 oder ≤ 1 mg pro kg Körpergewicht besonders bevorzugt sind. Aufgrund der langen Verweilzeit der Konjugate im Menschen ist dabei eine Gabe von höchstens einer Dosiseinheit pro Tag, bevorzugt pro Woche, mehr bevorzugt pro 2 Wochen ausreichend. Für Tiere, z.B. Mäuse, wird bevorzugt eine Dosiseinheit pro Tag verabreicht.

Für die Herstellung der erfindungsgemäß eingesetzten Konjugate ist eine effiziente kovalente Kopplung des Wirkstoffes an das Trägermolekül (also das Protein) von Bedeutung. Bei der Kopplung darf es insbesondere nicht zu einer unerwünschten Veränderung des Trägerproteins oder/und des Wirkstoffes kommen. Die bisher übliche Aktivierung Carboxylgruppen-haltiger organischer Verbindungen mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) erfordert bei Raumtemperatur oder bei +4 °C mehr als 12 Stunden (DP 41 22 210 A1; EP 0 879 604 A1; EP 0 820 308). Bei diesem Verfahren bilden sich zudem bei der Aktivierung unlösliche Substanzen, die zum Teil bereits während der Aktivierung und zum Teil beim Eintragen des aktivierte Wirkstoffs in eine wässrige Proteinlösung ausfallen und, damit das Konjugat medizinisch verabreicht werden kann, durch zeitaufwändige und teure Filtrations schritte zusätzlich zu der eigentlichen Produktreinigung abgetrennt werden müssen und nie 100 %-ig sind (wegen der lipophilen Domänen im Albumin).

Es bestand deshalb der Bedarf ein Verfahren zur Herstellung von Wirkstoff-Protein-Konjugaten bereitzustellen, bei dem diese Probleme nicht auftreten und bei dem insbesondere keine wasserunlöslichen Nebenprodukte gebildet werden.

Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines Konjugats enthaltend

- 8 -

i) eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung, insbesondere Methotrexat und

ii) ein Protein, insbesondere Albumin,

welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung und ein Protein in Gegenwart von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und von N-Hydroxysuccinimid umsetzt.

Überraschenderweise wurde festgestellt, dass durch die Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), insbesondere in Form des Hydrochlorids, eine Aktivierung der Carboxylgruppen-haltigen organischen Verbindung und eine Umsetzung mit einem Trägerprotein erreicht werden kann, ohne dass wasserunlösliche Nebenprodukte gebildet werden, die zeit- und kostenaufwändig abzutrennen wären. Durch dieses Verfahren werden Zwischenreinigungsschritte überflüssig und die Präparationszeit und damit auch die Herstellungskosten werden wesentlich reduziert. Weiterhin werden Probleme, die bei der Injektion des Konjuats in einen menschlichen oder tierischen Körper durch unlösliche Substanzen oder Nebenprodukte hervorgerufen werden, vermieden.

Die Aktivierung erfolgt bevorzugt bei einer Temperatur von 10 bis 100 °C, mehr bevorzugt 20 bis 70 °C und noch mehr bevorzugt 40 bis 65 °C für eine Reaktionszeit von 1 Minute bis 10 Stunden, mehr bevorzugt von 10 bis 30 Minuten. Die Umsetzung des aktivierte[n] Wirkstoffes mit dem Trägerprotein erfolgt vorzugsweise bei einer Temperatur zwischen 10 und 50 °C, insbesondere zwischen 20 und 40 °C.

Bevorzugt wird die Aktivierung der Carboxyl-haltigen Verbindung, insbesondere von Methotrexat mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und N-Hydroxysuccinimid in einem organischen Lösungsmittel, bevorzugt in Dimethylacetamid durchgeführt. Weitere geeignete organische Lösungsmittel sind z.B. DMSO (Dimethylsulfoxid) oder Dioxan. Die Aktivierung wird vorzugsweise unter Ausschluss von Wasser durchgeführt, insbesondere in Gegenwart von ≤ 5 Gew.-% Wasser, mehr bevorzugt ≤ 1 Gew.-% Wasser

und am meisten bevorzugt vollständig wasserfrei. Durch Aktivierung der Carboxylgruppen-haltigen Verbindung mit eingesetzten Substanzen EDC und N-Hydroxysuccinimid in einem organischen, wasserfreien Lösungsmittel reagieren diese nicht mit Protein, z.B. Albumin und verändern auch nicht dessen Struktur.

Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens besteht darin, dass die eingesetzten Aktivierungsreagenzien, also 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid sowie N-Hydroxysuccinimid eine hohe Wasserlöslichkeit aufweisen. Dadurch können bei der Umsetzung nicht verbrauchte Kopplungsreagenzien auf einfache Weise aus dem gewonnenen Produkt, beispielsweise durch Waschen mit Wasser entfernt werden. Im Gegensatz dazu verbleibt bei den im Stand der Technik verwendeten Kopplungsreagenzien, beispielsweise bei der Verwendung von Di-cyclohexyl-carbodiimid (DCC) ein nicht auftrennbarer Rest an Kopplungsreagenz im Konjugat. So ist bei einem Methotrexat-Albumin-Konjugats und Verwendung von DCC ein nicht abtrennbarer Rest von etwa 13 bis 15 Gew.-% an DCC im Konjugat zu beobachten, der wahrscheinlich an eine lipophile Domäne im Albumin gebunden ist. Dieser Rest kann nur mit Hilfe von HPLC nachgewiesen und nur unter erheblichem Aufwand präparativ abgetrennt werden.

Ein weiterer bevorzugter Aspekt der Erfindung betrifft ein optimiertes Herstellungsverfahren eines erfindungsgemäßen Konjugats enthaltend

- i) eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung und
- ii) ein Protein, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung und ein Protein in Gegenwart von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid umsetzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Carboxylgruppen-haltigen organischen Verbindung bevorzugt um ein Cytostatikum oder Immunsuppressivum, besonders bevorzugt um Methotrexat, Aminopterin und/oder N-Phthaloyl-L-Glutaminsäure,

insbesondere bevorzugt um Methotrexat. Beim Protein handelt es sich bevorzugt um Albumin.

Überraschenderweise wurde festgestellt, dass sich das optimierte  
5 Verfahren, welches ohne N-Hydroxysuccinimid arbeitet, bei der Reinigungsprozedur positiv auf die Vereinfachung der Herstellung auswirkt. Durch die Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimidhydrochlorid (EDC) zur Aktivierung ohne den Zusatz von N-Hydroxysuccinimid (HSI) beträgt die Aktivierungszeit von Aminopterin  
10 (AMPT), Methotrexat (MTX) bzw. N-Phthaloyl-L-glutaminsäure (NPLG) nur noch 10 Minuten. Ein weiterer Vorteil des optimierten Verfahrens liegt darin, dass nach Zugabe der aktivierte Wirkstoffe AMPT, MTX oder NPLG zu dem vorgelegten Protein, insbesondere Albumin, ohne N-Hydroxysuccinimid eine direkte Kontrolle der Kopplungseffizienz erfolgen kann. Bei  
15 Verwendung von N-Hydroxysuccinimid besitzt dieses bei der HPLC bei einer Einstellung der UV-Messzelle auf 280 nm ebenfalls eine hohe UV-Absorption und stört oder erschwert durch seine Retentionszeit von etwa 11,5 Minuten, bei der auch andere niedermolekulare Verbindungen erscheinen, eine direkte Bestimmung der Kopplungsausbeute. Dies  
20 bedeutet, dass in vielen Fällen eine Ausbeutebestimmung erst am Ende der Reinigung des Konjugats möglich ist. Durch das optimierte Verfahren ohne Einsatz von N-Hydroxysuccinimid kann dieser Faktor nun ausgeschlossen werden. Dies ist auch für die Produktsicherheit von großem Vorteil. Ein weiterer Vorteil des optimierten Verfahrens liegt darin, dass die  
25 Kopplungsausbeute überraschenderweise durchschnittlich bei 98 bis 99 % liegt.

Somit sind die Gesamtkosten des jeweiligen Konjugats durch diese Vereinfachung der Herstellung deutlich gesenkt.

30

Erfnungsgemäß werden bei der Umsetzung die Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung, insbesondere Methotrexat und das Protein,

- 11 -

insbesondere Albumin, in einem Molverhältnis von 10:1 bis 1:10, insbesondere 1,5:1 bis 1:1,5 eingesetzt.

Die mit den erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Konjugate können aufgrund ihrer hohen Reinheit für zahlreiche Verwendungen und insbesondere für eine intravenöse Verabreichung vorgesehen werden. Somit können solche Konjugate, beispielsweise bei Verwendung einer Carboxylgruppen-haltigen organischen Verbindung mit immunsuppressiver Wirkung vorteilhafterweise zur Herstellung von Arzneimitteln zur Modulierung einer Transplantations-assoziierten Immunreaktion, insbesondere zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe oder/und Behandlung von GVHD eingesetzt werden. Es ist aber auch möglich unter Verwendung von Carboxylgruppen-haltigen organischen Verbindungen mit cytostatischer Wirkung ein Arzneimittel zur Behandlung oder/und Prophylaxe oder/und Diagnose von Tumorerkrankungen herzustellen. Erfindungsgemäß hergestellte Konjugate eignen sich auch zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung oder/und Diagnose von Entzündungs-, Infektions- und/oder Hauterkrankungen.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und die beigefügten Figuren weiter erläutert.

Figur 1 zeigt ein HPLC-Chromatogramm des gemäß Beispiel 1 hergestellten Methotrexat-Humanserumalbumin (MTX-HSA) Konjugats, das nach dem Herstellungsverfahren unter Verwendung von N-Hydroxysuccinimid (NHSI) und damit der Synthese eines reaktiven Esters als Zwischenstufe arbeitet.

Figur 2 zeigt das Chromatogramm des gemäß Beispiel 3 hergestellten MTX-HSA-Konjugates ohne Verwendung von NHSI, wobei die mit 1-Ethyl-3-(3-dimeethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC) aktivierte Carboxylgruppe direkt zur Kopplung des MTX benutzt wird.

**Beispiel 1****Herstellungsbeispiel:**

Methotrexat (MTX) wird mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (HSI) aktiviert und anschließend mit Albumin (HSA) zu MTX-HSA umgesetzt.

**Methotrexat-Aktivierung:**

20 mg Methotrexat (MTX; FG: 454, 45; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) werden zusammen mit 25 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC, FW: 191,7, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 60 mg N-Hydroxysuccinimid (HSI, FW: 115,1; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in 2 ml Dimethylacetamid (DMAA) gelöst. Die Reaktionsmischung wird in ein auf 60 °C vorgeheiztes Wasserbad gebracht. Nach einer Reaktionszeit von etwa 30 min wird die Aktivierungslösung, nach Abkühlung auf Raumtemperatur, langsam in eine 5 %-ige HSA-Lösung (10 ml 20 %-ige HSA-Originallösung werden mit 30 ml H<sub>2</sub>O dest. verdünnt) eingetragen.

Die Abtrennung der für die Kopplung von MTX erforderlichen Begleitstoffe (DMAA, HSI, Dimethylharnstoff und nicht gebundenes Methotrexat) erfolgt über Ultrafiltration (Dialyse) mit einer Ausschlussgrenze von 30 KD (YM 30).

**Reinheitskontrolle (HPLC):**

Vorsäule:	25 x 10 mm LiChrospher DIOL, 5 µm
Säule:	250 x 10 mm LiChrospher DIOL, 5 µm
Laufmittel:	Na-Citrat, 02 M, pH 7,4
Fluss:	1,0 ml/min
Druck:	etwa 95 bar
UV-Monitor	280 nm

**Retentionszeiten:**

dimere SA-Fraktion	5,8 min
monomere SA-Fraktion	7,0 min
niedermolekulares MTX	33,8 min

Chromatogramm: siehe Figur 1

Beispiel 2

5 Tierversuche: (Genehmigungs Nr. LVL M-V310-4/7221.3-1.2-015/03  
Landesveterinäramt Mecklenburg-Vorpommern Rostock)

Mit dem lang zirkulierenden, makromolekularen MTX-HSA wurden erste statistisch signifikante Versuche mit GVHD-Tieren an der Universitätsklinik 10 Rostock in der Abteilung von Prof. Dr. M. Freund unter der Leitung von PD.Dr.G. Hartung und Dr. D. Wolff durchgeführt. Dabei wurden 20 weibliche F1 hybrid BN/Lew-Ratten nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 7,5 Gy (n = 10) oder 9 Gy (n = 10) mit 40 Millionen Knochenmarkszellen und 15 Millionen T-Lymphozyten von weiblichen Lew-Ratten transplantiert. 15 Ratten erhielten am Tag 0, 4, 8 und 12 jeweils 2 mg/kg Methotrexat-Albumin intraperitoneal, während 10 weitere Ratten lediglich die äquivalente Menge Albumin zu den identischen Zeitpunkten intraperitoneal erhielten. Im Ergebnis konnte nachgewiesen werden, dass lediglich eine Ratte aus der Gruppe, welche Methotrexat-Albumin erhielt, eine akute GVHD entwickelte, 20 während in der Kontrollgruppe alle Tiere an den Folgen einer akuten GVHD verstarben. Signifikante Nebenwirkungen von Methotrexat-Albumin waren nicht nachweisbar, während beiden mit äquieffektiven MTX-Dosen behandelten Tieren deutliche Nebenwirkung zu beobachten waren.

25

Beispiel 3

Optimiertes Herstellungsbeispiel:

Methotrexat (MTX) wird zusammen mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) 30 carbodiimid-hydrochlorid (EDC) in DMSO gelöst, durch Erwärmung zur Reaktion gebracht (aktiviert) und anschließend mit Albumin (HSA) zu MTX-HSA umgesetzt.

**Methotrexat-Aktivierung:**

20 mg Methotrexat (MTX; FG: 454, 45; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) werden zusammen mit 25 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC, FW: 191,7, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die Reaktionsmischung wird in ein auf 65 ° C vorgeheiztes Wasserbad gebracht. Nach einer Reaktionszeit von etwa 10 Minuten wird die Aktivierungslösung, nach Abkühlung auf Raumtemperatur, langsam in eine 5 %ige HSA-Lösung (10 ml 20 %ige HSA-Originallösung werden mit 30 ml Aqua dest. verdünnt) eingetragen.

10

Die Abtrennung der für die Kopplung von MTX (AMPT bzw. NPLG) erforderlichen Begleitstoffe (DMSO, Ethyl-3-dimethylaminopropylharnstoff und nicht gebundener Wirkstoff) erfolgt durch Ultrafiltration (Dialyse) mit einer Ausschlussgrenze von 30 KD (YM 30, Millipore).

15

**Reinheitskontrolle (HPLC):**

Vorsäule: Reprosil 200 SEC, 5 x 4 mm, 5 µm (Dr. Maisch)  
Säule: Reprosil 200 SEC, 300 x 4,6 mm, 5 µm (Dr. Maisch)  
Laufmittel: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,19 M, pH 7,4 mit 5 % Methanol  
20 Fluss: 0,3 ml/min  
Druck: etwa 51 bar

**Retentionszeiten:**

dimere SA-Fraktion	8,2 min
monomere SA-Fraktion	9,1 min
niedermolekulares MTX	13,3 min

Chromatogramm: siehe Figur 2

**Ansprüche**

1. Verwendung eines Konjugats, umfassend eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung und ein Protein zur Herstellung eines Arzneimittels zur Modulierung einer Transplantations-assoziierten Immunreaktion.  
5
2. Verwendung nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Vermeidung einer Transplantations-assoziierten Immunreaktion.  
10
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe oder/und Behandlung von GVHD (Graft Versus Host Disease).  
15
4. Verwendung nach Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich um eine akute GVHD handelt.
- 20 5. Verwendung nach Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich um eine chronische GVHD handelt.
6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich bei der Transplantation um eine Knochenmarktransplanta-  
tion handelt.  
25
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich bei der Transplantation um eine Organtransplantation,  
insbesondere um eine Nieren-, Herz- oder Lebertransplantation  
handelt.  
30

8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich um eine allogene Transplantation handelt.
- 5
9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung ausgewählt  
ist aus Cytostatika oder Immunsuppressiva.
- 10
10. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich bei der Carboxylgruppen-haltigen organischen Ver-  
bindung um Methotrexat oder Aminopterin handelt.
- 15
11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich bei dem Polypeptid um ein natives humanes Polypeptid  
handelt.
- 20
12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich bei dem Polypeptid um Albumin, insbesondere um  
humanes Albumin handelt.
- 25
13. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich bei dem Konjugat um ein Methotrexat-Albumin-Konjugat  
handelt.
- 30
14. Verfahren zur Herstellung eines Konjugats enthaltend
    - i) eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung und
    - ii) ein Protein,

dadurch gekennzeichnet,  
dass man eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung und ein Protein in Gegenwart von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und von N-Hydroxysuccinimid umsetzt.

5

15. Verfahren nach Anspruch 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich bei der Carboxylgruppen-haltigen organischen Verbindung um ein Cytostatikum oder ein Immunosuppressivum handelt.

10

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich bei der Carboxylgruppen-haltigen organischen Verbindung um Methotrexat handelt.

15

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass das Protein Albumin ist.

20

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass man die Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung in einem organischen Lösungsmittel, insbesondere in einem wasserfreien organischen Lösungsmittel mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid und N-Hydroxysuccinimid aktiviert und anschließend die aktivierte Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung mit dem Protein umsetzt.

25

19. Verfahren zur Herstellung eines Konjugats enthaltend
  - i) eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung und
  - ii) ein Protein,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass man eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung und

ein Protein in Gegenwart von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbonyldiimid umsetzt.

20. Verfahren nach Anspruch 19,

5 dadurch gekennzeichnet,

dass es sich bei der Carboxylgruppen-haltigen organischen Verbindung um ein Cytostatikum oder ein Immunsuppressivum handelt.

10 21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20,

dadurch gekennzeichnet,

dass es sich bei der Carboxylgruppen-haltigen organischen Verbindung um Methotrexat, Aminopterin und/oder N-Phthaloyl-L-Glutaminsäure handelt.

15

22. Verfahren nach Anspruch 21,

dadurch gekennzeichnet,

dass es sich bei der Carboxylgruppen-haltigen organischen Verbindung um Methotrexat handelt.

20

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 22,

dadurch gekennzeichnet,

dass das Protein Albumin ist.

25

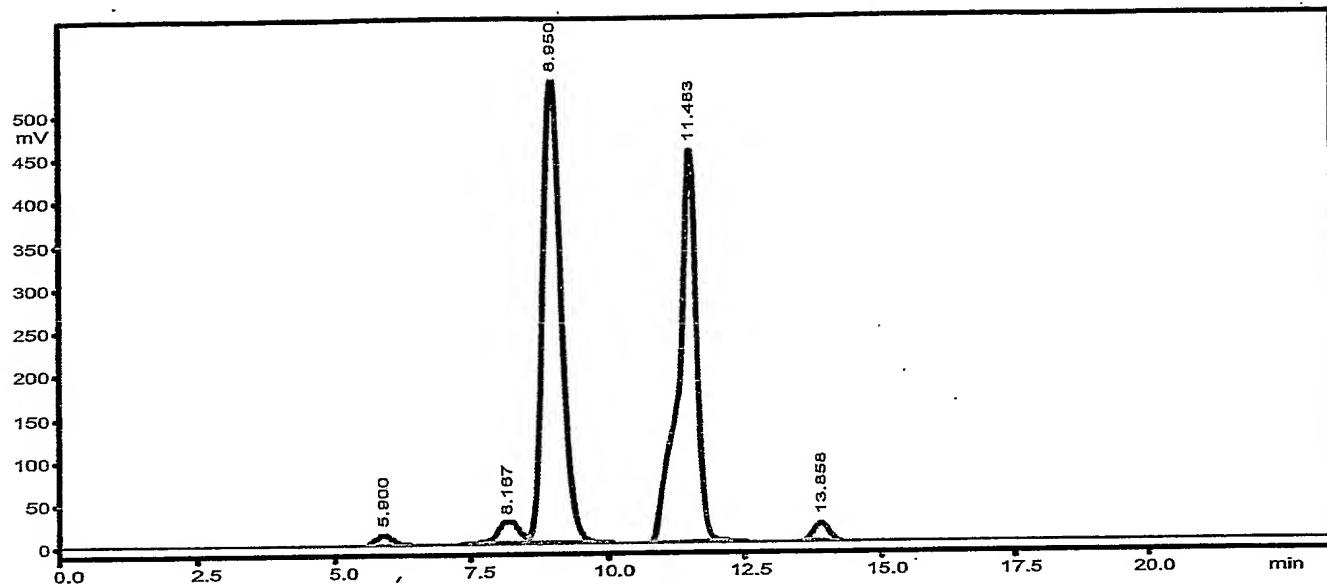
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 23,

dadurch gekennzeichnet,

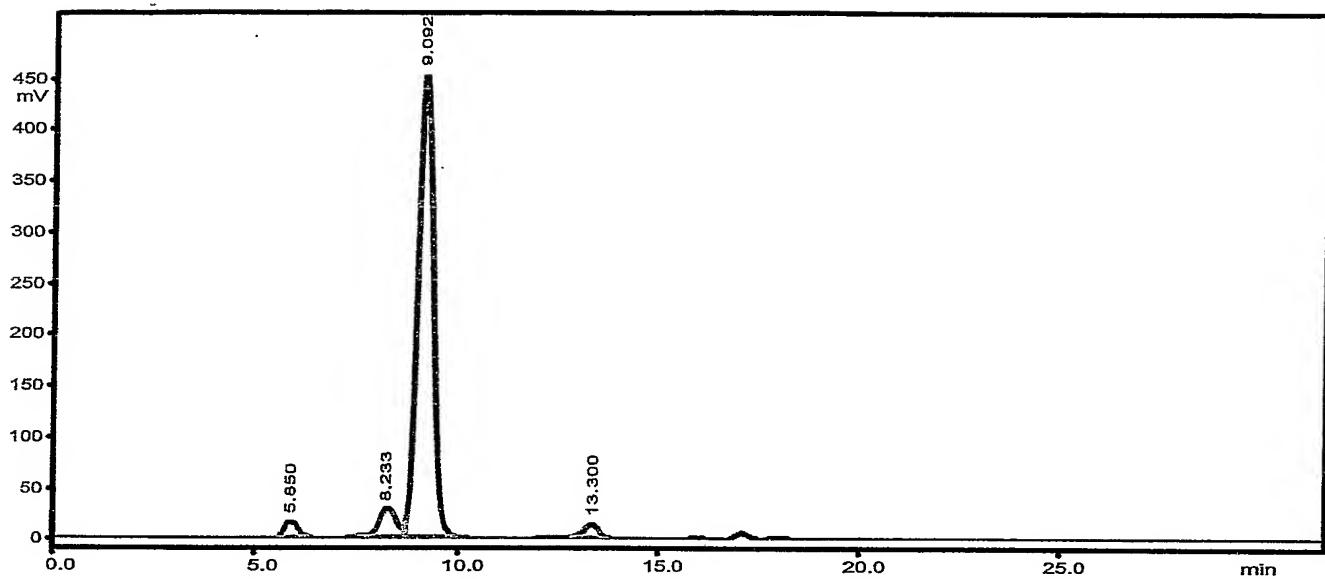
dass man die Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung in einem organischen Lösungsmittel, insbesondere in einem wasserfreien organischen Lösungsmittel, mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid umsetzt, durch Erwärmung aktiviert und anschließend die aktivierte Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung mit dem Protein umsetzt.

30

Figur 1



Figur 2



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No PCT/EP2005/003460
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K47/48 A61K31/505 A61P37/06
--

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC
---

<b>B. FIELDS SEARCHED</b>
---------------------------

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K A61P
--

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
---

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
--

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data
---

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>
---

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WOLFF DANIEL ET AL: "Methotrexate-albumin and aminopterin-albumin are effective in prophylaxis of experimental acute GVHD." <i>BLOOD</i>, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), page 404b, XP008047268</p> <p>&amp; 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2003</p> <p>ISSN: 0006-4971</p> <p>abstract</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-13

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.
--

<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
--

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
---

21 July 2005
--------------

Date of mailing of the international search report
--

03/08/2005
------------

Name and mailing address of the ISA
-------------------------------------

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016
---

Authorized officer
--------------------

Winger, R
-----------

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/003460

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VALLERA DANIEL A ET AL: "Anti-graft-versus-host disease effect of DT-390-anti-CD3sFv, a single-chain Fv fusion immunotoxin specifically targeting the CD3-epsilon moiety of the T-cell receptor" BLOOD, vol. 88, no. 6, 1996, pages 2342-2353, XP000645998 ISSN: 0006-4971 abstract -----	1-9
X	EP 0 282 057 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 14 September 1988 (1988-09-14) examples -----	14-24
A	KRATZ F: "Drug conjugates with albumin and transferrin" EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS 2002 UNITED KINGDOM, vol. 12, no. 3, 2002, pages 433-439, XP002337252 ISSN: 1354-3776 the whole document -----	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International Application No  
PCT/EP2005/003460

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0282057	A 14-09-1988	AU 1301788 A		15-09-1988
		CN 88102026 A		28-09-1988
		DK 134288 A		12-09-1988
		EP 0282057 A2		14-09-1988
		JP 63301833 A		08-12-1988
		NO 881077 A		12-09-1988

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/003460

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 IPK 7 A61K47/48 A61K31/505 A61P37/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 7 A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>WOLFF DANIEL ET AL: "Methotrexate-albumin and aminopterin-albumin are effective in prophylaxis of experimental acute GVHD."  <b>BLOOD</b>,          Bd. 102, Nr. 11,          16. November 2003 (2003-11-16), Seite          404b, XP008047268  &amp; 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN  SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA;  DECEMBER 06-09, 2003  ISSN: 0006-4971  Zusammenfassung</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-13

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- <sup>o</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
21. Juli 2005	03/08/2005
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Winger, R

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/003460

**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	VALLERA DANIEL A ET AL: "Anti-graft-versus-host disease effect of DT-390-anti-CD3sFv, a single-chain Fv fusion immunotoxin specifically targeting the CD3-epsilon moiety of the T-cell receptor" BLOOD, Bd. 88, Nr. 6, 1996, Seiten 2342-2353, XP000645998 ISSN: 0006-4971 Zusammenfassung -----	1-9
X	EP 0 282 057 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 14. September 1988 (1988-09-14) Beispiele -----	14-24
A	KRATZ F: "Drug conjugates with albumin and transferrin" EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS 2002 UNITED KINGDOM, Bd. 12, Nr. 3, 2002, Seiten 433-439, XP002337252 ISSN: 1354-3776 das ganze Dokument -----	

## INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/003460

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0282057	A 14-09-1988	AU 1301788 A	15-09-1988
		CN 88102026 A	28-09-1988
		DK 134288 A	12-09-1988
		EP 0282057 A2	14-09-1988
		JP 63301833 A	08-12-1988
		NO 881077 A	12-09-1988